

明細書

実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする方法

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロ流路チップを用いて、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする方法に関する。本発明の方法を用いることにより、微量の動物血清ないしは体液を用いて、閉鎖系において迅速且つ高感度に、実験動物の感染病の原因となる微生物の検出を行うことができる。

背景技術

[0002] 動物を扱って実験を行うにあたり、人間に有害な病原体が実験動物に潜んでいて人に感染する可能性がある。また実験動物が保持する病原体により実験操作以外で死ぬ可能性や、実験動物が感染病の潜伏期間中である恐れもある。かかる場合には動物実験の信頼性が保証されず、実験自体の不成立を導く可能性もある。そのような危険性を考えると、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする必要性がある。そしてそのような微生物のモニタリングを行うことにより、実験動物の感染を早期に発見し、感染微生物を同定することができる。その結果、感染の程度をできるだけ速やかに且つ正確に知り、適切な安全対策や施設対策を施すことが可能となる。

[0003] 従来、実験動物の感染病の微生物モニタリングには、酵素免疫測定法(ELISA法)が広く用いられてきた。このELISA法によれば、実験動物から採血された一定量(通常 $100\mu l$ 程度)の血液を希釈(通常10から50倍に希釈)した検体を用い、微生物抗原を固定した96穴プレートで起こった抗原抗体反応を行い、抗原と結合した抗体を酵素標識した二次抗体などで検出することにより感染の判定を行う。ELISA法は本技術分野で汎用されている手法であり、種々の教科書や実験プロトコールなどに記載されており、例えば実験動物感染病の対応マニュアル:監修前島一淑、発行株式会社アドスリー、平成12年発行を参照することができる。

発明の開示

[0004] 従来用いられている実験動物の感染病の微生物モニタリング法は、一回の検査に

多くの血液を必要とする(マウスの場合 $100\mu l$ でも全血液量の1/10に相当する)ので、以下に述べるようないくつかの解決すべき課題があった。

- (1) 母集団の抜き取り検査成績から母集団の微生物学的状態を推定する方法を採用せざるを得ない。
- (2) 同一個体での検査を繰り返し継続的に行うことができないため、複数の異なる動物を抜き取って経過を推定しなければならない。
- (3) 検査の操作と抗原抗体反応に時間がかかる。
- (4) 検査操作や検出を開放系で行うので、人への感染を防ぐための装置と細心の注意が必要である。

[0005] 上記課題を解決するべく本発明は、実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体をマイクロ流路チップに直接的に又は間接的に固定化し、当該マイクロ流路チップの微細流路に実験動物より採取した被験サンプルを流し、当該マイクロ流路チップ上で抗原抗体反応を行い、更に当該抗原抗体反応を検出することからなる、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする方法を提供するものである。

[0006] 更に本発明は、実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体を直接的に又は間接的に固定化したマイクロ流路チップを、当該微生物をモニタリングするために使用する方法を提供するものである。

[0007] 更に本発明は、実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体が直接的に又は間接的に固定化され、当該微生物をモニタリングするために使用されるマイクロ流路チップを提供するものである。

[0008] 本発明によりマイクロ流路チップを用いて微細な流路上で抗原抗体反応を行うことにより、動物の病原菌による感染を、効率良く高い感度で検出することが可能となつた。その結果、本発明の方法を用いることにより、微量の動物血清ないしは体液(従来の約1/100量)で検査ができるので以下の有利な効果を得ることが可能となつた。

- (1) 採血やサンプル採取から検査までの操作が簡便である。
- (2) マウスやラットなどの小動物において動物への負担が軽いので、一匹の動物から高い頻度で採血することができ、連続した検査ができる。

(3) 実験を継続しながら微生物モニタリングをすることができる。

(4) ハイスループットで集団の検査をすることができる。

[0009] 更に、本発明の方法は、マイクロ流路チップを用いた系は検査系が完全閉鎖系であり、かつ簡便で迅速に操作を行うことができるので、人への病原菌感染や施設汚染などの危険性が低く、実験動物感染病の原因となる微生物のモニタリングを安全に行うことができるという利点もある。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、マイクロ流路チップの構造を示す図である。

[図2]図2は、マイクロ流路チップ上でマイコプラズマ抗原と抗体との反応を検出した結果を示す写真及びグラフである。

[図3]図3は、抗体の希釈倍率と蛍光強度の間の相関性を示したグラフである。

[図4]図4は、マイクロ流路チップでの交差反応試験の結果を示した写真である。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 本発明は、感染病の原因となる微生物の抗原または抗体などの検出分子をマイクロ流路チップに固定化し、チップの微細流路に実験動物より採取した血清や体液を流し、チップ上での抗原抗体反応を検出することにより、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする方法である。

[0012] 本発明者らは、多数の蛋白質あるいはDNAと他の化合物との結合をマイクロチップ上で検出し、更には結合した化合物を回収してその同定を行えるような構造を持つ生体高分子マイクロチップを提供することを目的としてマイクロ流路チップの開発を行い、特開2002-243734号公報において報告している。本願明細書においてマイクロ流路チップとは、特開2002-243734号公報記載のマイクロチップ、又は該マイクロチップを試験するべきサンプルや実験条件に応じて適宜改変したものと意味するものである。しかし本発明において使用されるマイクロ流路チップは必ずしも特開2002-243734号公報記載のものに限定されるものと解されるべきではなく、本発明の技術思想の範囲内において他のマイクロチップを使用することも可能である。

[0013] 特開2002-243734号公報記載のマイクロ流路チップは、生体高分子を固定化したスポット、それを支持する基板部分、そこへさらに液体を供給する微細流路部分、及

び反応物を回収する微細流路部分から構成される。そのために特開2002-243734号公報記載のマイクロ流路チップを用いると、微量な生体高分子と試料との結合をマイクロチップ上で検出したり、結合した化合物を回収して同定を行うことができる。図1に、特開2002-243734号公報記載のマイクロ流路チップの構造を示す。

- [0014] 特開2002-243734号公報記載のマイクロ流路チップ(図1)において、ガラスあるいはプラスチック製である第1の基板1の上に生体高分子(本発明の場合には病原微生物の抗原や抗体)のスポット2がアレイ状に形成されている。基板1の生体高分子の固定は、スポットがアレイ上に形成されるものでも(図1)、スポットの代わりに直線状あるいは曲線状のストリップないしは任意の形状のものを、使用目的に応じて流路に対して任意の角度に任意の位置にエレクトロスプレイ・デポジション法で形成させたものも用いることができる。そして特開2002-243734号公報記載のマイクロ流路チップは更に第2の基板3を有し、第2の基板3の片面には凹部4が設けられており、第1の基板1のスポット2形成側と第2の基板3の凹部4側とを接合させることにより、閉じた微細流路及び反応場を形成し、反応すべき液体が適切に供給されるようになっている。
- [0015] 第2の基板3の凹部4の端部にはそれぞれ貫通部が設けられており、それぞれ供給用開口5と回収用開口6として使用する。なお供給用開口5から流入した液体は微細流路に流れ、この流路は枝分かれしており、液体が全てのスポット部分へ並列的に均等に流れ、スポット部分を通過した後、最終的には1つの流路として集束し、回収用開口6から排出するように設計されている。
- [0016] このような構造のマイクロ流路チップを用いて微細な流路上で抗原抗体反応を行うことにより抗原抗体反応の効率が改善され、感染病の原因となる微生物の抗原を、高感度且つ短時間で正確に検出することが可能となる。そこでマイクロ流路チップを用いた本発明の方法によれば、実験動物の微量の血清ないしは体液(従来の約1/100量以下、0.5-20 μ l)を採取するのみで、感染症の原因微生物を迅速且つ高感度にモニタリングすることができる。またマイクロ流路チップの系は完全閉鎖の検出系であるために、安全であるという利点も有する。また、微量な検体で簡便に検査できるため、同一の個体において繰り返し継続的な微生物モニタリングを行うことができる。
- [0017] 本発明の方法においては、まず実験動物の病原微生物の抗原をマイクロ流路チッ

ブの基板にスポットし基板上に固定化する。なおここでいう抗原には、病原微生物の抗原蛋白質、脂質、細胞壁多糖などが含まれる。抗原の固定化方法としては、これに限定するものではないが、エレクトロスプレイ・デポジション法を採用することが好ましい。生体高分子の固定化方法としてエレクトロスプレイ・デポジション法は当業者に良く知られており、例えば国際公開WO98/58745の記載を参考にすることができる。

- [0018] 固定化基板表面は、抗原または抗体と結合するためにアルデヒド、エポキシ、スクシニド、マレイミド、チオール、アミノ、カルボニルなどの官能基で被覆されていることが好ましい。しかし表面を被覆する官能基はこれらに限定されるものではない。
- [0019] なお抗原蛋白質などを固定化した後、後に流す披験サンプル中の蛋白質が基板上に非特異的に吸着することを防ぐために、スキムミルクや牛血清アルブミンなどの蛋白質溶液を用いてブロッキング反応を行うことは本発明において好ましい。
- [0020] 病原微生物の抗原が固定化されたマイクロ流路チップの流路に、試験する対象である実験動物より得られた披験サンプルを流し、マイクロ流路チップ上で反応させる。すると披験サンプル中に抗原に対する抗体が存在している場合には固定化された抗原と反応する。抗原抗体反応を行う時間は特に限定されるものではないが、好ましくは5分から30分程度である。そして反応を行った後に緩衝液を流路に流すことにより、抗原と結合していない抗体を洗い流す。
- [0021] その後、流路に上記の抗体を認識することができる標識二次抗体を流し、抗原と結合した抗体を、二次抗体の標識により検出する。例えばマウス由来の抗体を検出する場合には、蛍光などの手段で標識された抗マウス抗体を二次抗体として用いることにより、マイクロ流路チップの抗原と結合した抗体を検出することができる。標識の手段は蛍光標識に限定されるものではなく、放射標識した抗体あるいは二次抗体に結合する酵素(ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフェオヌクターゼなど)抗体なども使用することができる。披験動物が、その抗原蛋白質が由来する病原微生物に感染している場合、あるいは感染歴がある場合には、その抗原に対する抗体が血清中に存在するために、抗原に対する抗体の結合量で感染や感染の罹患歴を判定することができる。
- [0022] なおエレクトロスプレイ・デポジション法により、マイクロ流路チップの基板上に抗体

を固定化することもできる。かかる場合には、固定化された抗体と披験サンプル中に存在する抗原が反応するものと考えられる。かかる方法を採用することにより、披験サンプル中の抗原を検出することも可能であり、かかる態様も本発明の範囲内である。抗原を検出する方法では感染歴を検出することはできないが、感染した病原微生物が披験動物中に存在する場合には有効である。

- [0023] ところで上記において述べた方法は抗原又は抗体を直接的にマイクロ流路チップの基板上に固定化するという態様である。しかし以下に述べるように、抗原または抗体に付したタグを特異的に認識するリガンドを使用して抗原または抗体をマイクロ流路チップの基板上に間接的に固定化するという態様も本発明の範囲内である。ここで抗原または抗体に付したタグを特異的に認識するリガンドの例としては、アビジン、グルタチオンやニッケルキレート基及びアミロース、更に抗FLAG抗体などの抗タグ抗体などを挙げることができるが、それらに限定されるものではなく、他のリガンドも適宜使用することができる。例えばアビジンはビオチンを特異的に認識するリガンドであるために、ビオチントグが付された蛋白質はアビジンが固定化された基板上に結合する。
- [0024] 遺伝子組み換えの手法により、ビオチントグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ、ヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質タグ、FRAGタグなどを導入した病原微生物の抗原または抗体を発現する大腸菌や細胞を作製する。上記の特異的なりガンドが固定化されたマイクロ流路チップに上記の大腸菌または細胞由来の粗抽出液あるいはそれより精製した蛋白質を流すと、上記の特異的なりガンドとその抽出液中に含まれる抗原は上述したようにタグを介して結合する。すなわち、リガンドを介して抗原をマイクロ流路チップの基板上に間接的に固定化することができる。病原微生物の抗原を間接的に固定化した後に、マイクロ流路チップの流路に披験サンプルを流してマイクロ流路チップ上で抗原抗体反応を行うことにより、披験サンプル中の抗体を検出することができる。
- [0025] また他の間接的な固定化方法として、抗原を認識する抗体(一次抗体)に対する二次抗体をマイクロ流路チップの基板上に固定化することもできる。そして抗原または一次抗体をマイクロ流路に流すことでその抗原または一次抗体は基板上に結合する

。このように二次抗体を介して抗原または一次抗体をマイクロ流路チップの基板上に間接的に固定化することも可能である。そしてマイクロ流路チップの流路に披験サンプルを流してマイクロ流路チップ上で抗原抗体反応を行うことにより、披験サンプル中の抗体または抗原を検出することができる。

- [0026] また抗原又は抗体を固定化する手法は、マイクロ流路チップの基板に抗原又は抗体を固定化するという態様に限定されるものではない。他の態様として、固定化をするべき抗原又は抗体をマイクロビーズまたはナノファイバーの表面に固定化し、かかるマイクロビーズをマイクロ流路内に挿入するという方法によっても同様の効果を得ることが可能である。
- [0027] マイクロ流路の途中に堰を設け、抗原又は抗体が固定化されたマイクロビーズまたはナノファイバーを流すと、堰によりマイクロビーズまたはナノファイバーがせき止められる。そしてマイクロ流路チップの流路に披験サンプルを流すと、マイクロビーズまたはナノファイバーに固定化された抗原と披験サンプル中の抗体の間で抗原抗体反応が起こるために、披験サンプル中の抗体を検出することができる。
- [0028] また抗原と特異的に結合するリガンドや二次抗体を固定化したマイクロビーズまたはナノファイバーを用いて、抗原を該マイクロビーズまたはナノファイバー上に固定化するということも可能である。具体的には抗原に付したタグを特異的に認識するリガンドや二次抗体が結合したマイクロビーズまたはナノファイバーを、途中に堰を設けたマイクロ流路に流すと、そのマイクロビーズまたはナノファイバーは流路中にせき止められる。
- [0029] その後に遺伝子組み換えの手法により作製したタグを付した抗原あるいは抗原そのものを流路に流すと、せき止められたマイクロビーズまたはナノファイバー上のタグまたは二次抗体を介して抗原が特異的に結合するために、マイクロビーズまたはナノファイバー上に抗原を間接的に固定化することができる。そして抗原が間接的に固定化されたマイクロビーズまたはナノファイバーが存在するマイクロ流路に披験サンプルを流すことにより、披験サンプル中の抗体を検出することもできる。
- [0030] ここで使用するマイクロビーズまたはナノファイバーの大きさは、好ましくは μm から数 $10\ \mu\text{m}$ である。また該マイクロビーズまたはナノファイバーの材質は、アガロース、

デキストラン、セルロース、キトサンなどの多糖類や、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなどの合成高分子である。しかしマイクロビーズまたはナノファイバーの大きさや材料はこの範囲内に限定されるものではなく、必要に応じて適切なものを適宜選択することができる。

- [0031] マイクロビーズやナノファイバーの表面は、抗原または抗体と結合するために、アルデヒド、エポキシ、スクシニド、マレイド、チオール、アミノ、カルボニル基などの官能基で被覆されていることが好ましい。しかし表面を被覆する官能基はこれらに限定されるものではない。
- [0032] 具体的なマイクロビーズの例としては、ポリスチレン製ラテックスビーズ(シグマ製、平均粒径 $0.1\mu m$ 、 $0.3\mu m$ 、 $0.46\mu m$ 、 $0.6\mu m$)などを挙げることができる。このビーズの表面は疎水性のためにタンパク質を吸着することができ、そのために抗原や抗体あるいはリガンドの固定化に使用できる。
- [0033] 本発明における披験サンプルとして、試験を行う対象である実験動物に由来する血清、血漿、尿、リンパ液や髄液などを挙げることができ、血清や血漿は特に好ましいサンプルである。しかし披験サンプルとして使用される体液はこれらに限定されず、必要に応じて種々のサンプルを使用することができる。
- [0034] 本発明において感染病の原因となる微生物のモニタリングの対象となる実験動物として、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、ブタ、サル、トリおよびイヌなどが挙げられるが、特にマウスとラットは実験動物として最も汎用されている。しかし上記に挙げた例に限定されるものではなく、実験動物として使用されている他の動物においても本発明の方法により病原微生物のモニタリングを行うことができる。加えて近年ではそれらの実験動物に遺伝子操作を加えた形質転換動物なども生化学・医学の研究に広く用いられているが、かかる形質転換動物においても本発明の方法により病原微生物のモニタリングを行うことができる。
- [0035] 本発明において、モニタリングの対象となる微生物として、実験動物感染病の対応マニュアル(監修前島一淑、発行株式会社アドスリー、平成12年発行)21ページ資料1-2に記載の微生物などを挙げができる。しかし本発明の方法は検出対象となる微生物の範囲を特に限定するものではなく種々の微生物をモニタリングすることができる。

できる。よって検出の対象となる微生物は上記の文献に記載されたものに限定されるものではない。

- [0036] なお実験動物がマウスの場合には、マウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、エレトメリアウイルス(Ectomrlia virus)、マウスアデノウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、マウスロタウイルス(Mouse rotavirus, EDIMV)、マウスパルボウイルス(Mouse parvovirus, MVM/MPV)、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus, TMEV)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice, PVM)、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス(Lactose dehydrogenase elevating virus)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、パステツレラ・ニューモトロビカ(Pasteurella pneumotropica)、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、エシェリキア・コリ O115 a,c;K(B)(Escherichia coli O115 a,c;K(B))、ヘリコバクター・ヘルペティカス(Helicobactor hepaticus)、ショードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spirotrichomonas muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))が主な検疫や微生物モニタリングの対象となる。
- [0037] また実験動物がラットの場合には、マウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、マウスアデノウイルス、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、ラットパルボウイルス(Rat parvovirus(KRV/H-1/RPV))、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus(TMEV))、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice(PVM))、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)

、コリネバクテリウム・クッチャリ（ネズミコリネ病菌、*Corynebacterium kutscheri*）、ボーデテラ・ブロンチセプティア（*Bordetella bronchiseptica*）、パストレラ・ニューモトロピカ（*Pasteurella pneumotropica*）、ストレプトコッカス・ニューモニアエ（*Streptococcus pneumoniae*）、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス（カーバチルス）（*Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus*）、シードモナス・アエルギノサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、ニューモシスティス・カリニ（*Pneumocystis carinii*）、ギアルディア・ムリス（*Giardia muris*）、スピロヌクレウス・ムリス（*Spiroplasm muris*）及びヘルミンス（蟻虫）（*Helminths(pinworms)*）が主な検疫や微生物モニタリングの対象となる。

実施例

[0038] 下記の実施例や図面を用いて本発明を更に詳しく説明するが、その記載は本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0039] （実施例1）

以下の実験において括弧内の組成からなるPBS (Na_2HPO_4 0.61g, KH_2PO_4 0.19g, NaCl 8.00g, KCl 0.20g, MilliQ(ミリポア) 1L)、PBST(0.05% Tween20-PBS)、および洗浄液(2%スキムミルク-PBST)、ブロッキング液(2%スキムミルク-PBST)を用いた。また抗原抗体反応を行う基板の表面をIndium-Tin Oxide(ITO)で被覆し、さらにその上にアルデヒド基が導入されたガラス基板(松浪ガラス製、26x76mm)を使用した。

[0040] 最初に、基板上にエレクトロスプレイ・デポジション装置(フューエンス製)を用い、マイクロプラズマ抗原(MP)(デンカ生研)を約 $0.45 \mu\text{g}$ スプレーした。スプレーには、幅 $200 \mu\text{m}$ 、長さ12mmのスリットが空いたガラスマスクを用いた。このマスクを用いることにより、抗原は基板の上に、細長い線状にデポジットされた。そしてこの基板を、幅 $400 \mu\text{m}$ ×深さ $100 \mu\text{m}$ の溝が8つ設けられたポリジメキルシロキサン製の流路に、スプレー面が流路側になるようにセットした。流路が基板の長軸方向に伸びており、また抗原は短軸方向に伸びているので、両者が交差する点で抗原抗体反応が起こり、病原菌に対する抗体の存在は四角いスポットとして検出される。

[0041] 次にこの流路を飽和水蒸気条件下で 30°C 、10分反応を行い、基板上のアルデヒド基と抗原タンパクの架橋反応を行った。その後それぞれの流路に対し、洗浄液を $3 \mu\text{l}$

ずつ3回流して未反応の抗原を洗浄した。そしてブロッキング液3 μ lを加え、室温で10分間ブロッキング反応を行った。

- [0042] ブロッキング後、マウス由来抗マイコプラズマ抗体(デンカ生研)をMilliQ水(ミリポア)で順次希釈し、各流路に3 μ lずつ流した。そして室温で10分間、抗原抗体反応を行った。その後流路をPBST 3 μ lで3回洗浄し、結合していない余分な抗体を洗い落とした。
- [0043] そして二次抗体として10 μ g/mlのAlexa Fluor 488標識抗マウス抗体(モレキュラープローブ)ーブロッキング液を3 μ lずつ流して、室温で10分間、抗原抗体反応を行った。その後PBST、PBSの各々3 μ lで3回ずつ洗浄し、余分な標識抗体を流し落とした。
- [0044] 冷却CCDカメラをつけたオリンパスSRX9顕微鏡を用い、Alexa488の蛍光を測定した。測定した画像はArrayPro(プラネットロン)を用い、スポットあたりの蛍光の強度を測定した。
- [0045] 蛍光強度を測定した結果を図2に示す。図2(a)は蛍光の画像写真であり、コントロールは抗マイコプラズマ抗体を流していない流路である。コントロールにほとんど蛍光が見られないことから、非特異的な結合はほとんど見られなかった。また図2(b)はそれぞれのスポットの蛍光強度を写真から定量化した結果である。図2(b)において抗体の希釈倍率が40–640倍の間で、希釈倍率の対数と蛍光強度の間に相関性が認められた。なお図3は抗体の希釈倍率と蛍光強度の間の相関性を示したグラフである。希釈倍率が40–640倍の間の範囲における相関係数R²は0.950と高い値であり、良い相関性があることが判った。
- [0046] (実施例2)

クロスコンタミネーションを調べるために交差反応性を調べた。実施例1と同様にして、マウス肺炎ウイルス(MHV)(デンカ生研)、センダイウイルス(HVJ)およびマイコプラズマ(MP)を、エレクトロスプレイ・デポジション装置を用いてスプレーした。その後、各流路に一次抗体としてマウス由来抗MHV抗体、抗HVJ抗体、抗MP抗体(デンカ生研)を流して、抗原抗体反応を行った。そして基板上に結合している抗体量を、Alexa Fluor 488標識抗マウス抗体を二次抗体として用いて検出した。このとき一次

抗体を流さない流路を設け、コントロールとした。その結果を図4に示す。その結果、コントロールにおいては非特異的な二次抗体の結合は見られなかった。一方、それぞれの抗体がそれぞれの抗原を特異的に認識していることが判った。

[0047] (実施例3)

マウスから採血した血清を用いて実際のサンプルにおける実験を行った。マウス肺炎ウイルス(MHV) (デンカ生研)、センダイウイルス(HVJ) およびマイコプラズマ(MP)を、エレクトロスプレー・デポジション装置を用いてスプレーしたマイクロ流路チップ固定化した。微生物モニタリングに供するマウスの血清を10倍希釈した検体 $10\ \mu l$ を流路に流し、次に標識抗マウス抗体を作用させて検出した。この結果、検体中にマウス肺炎ウイルスの抗体が検出された。よってこのマウスはマウス肺炎ウイルスに感染しているか、あるいは感染の履歴があるものと考えられる。

産業上の利用可能性

[0048] 本発明により、感染病の原因となる微生物の抗原や抗体などの検出分子を固定化したマイクロ流路チップを用い、チップの微細流路に実験動物より採取した血清や体液を流し、チップ上での抗原抗体反応を検出することにより、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングすることが可能となった。本発明の方法は動物実験の現場において有用であり、動物実験の量及び質の向上に繋がるものである。そしてひいては、動物実験が不可欠である医薬や化粧品の開発に資するものと考えられる。

請求の範囲

- [1] 実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体をマイクロ流路チップに直接的に又は間接的に固定化し、当該マイクロ流路チップの微細流路に実験動物より採取した披駿サンプルを流し、当該マイクロ流路チップ上で抗原抗体反応を行い、更に当該抗原抗体反応を検出することからなる、実験動物の感染病の原因となる微生物をモニタリングする方法。
- [2] 前記抗原又は抗体をエレクトロスプレイ・デポジション法でマイクロ流路チップに直接的に又は間接的に固定化することを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [3] 前記実験動物がマウス又はラットである、請求項1記載の方法。
- [4] 前記実験動物がマウスであつて、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、エレトメリアウイルス(Ectomrlia virus)、マウスアデノウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、マウスロタウイルス(Mouse rotavirus、EDIMV)、マウスパルボウイルス(Mouse parvovirus、MVM/MPV)、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus、TMEV)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice、PVM)、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス(Lactose dehydrogenase elevating virus)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、パステツレラ・ニューモトロビカ(Pasteurella pneumotropica)、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、エシェリキア・コリ O115 a,c;K(B)(Escherichia coli O115 a,c;K(B))、ヘリコバクター・ヘパティカス(Helicobactor hepaticus)、シュードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spirotrichomonas muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である、請求項1記載の方法。

- [5] 前記実験動物がラットであって、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、マウスアデノウイルス、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、ラットパルボウイルス(Rat parvovirus(KRV/H-1/RPV))、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus(TMEV))、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice(PVM))、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、ボーデテラ・ブロンチセプティア(Bordetella bronchiseptia)、パステツレラ・ニューモトロピカ(Pasteurella pneumotropica)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ(Streptococcus pneumoniae)、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spiroucleus muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である、請求項1記載の方法。
- [6] 実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体を直接的に又は間接的に固定化したマイクロ流路チップを、当該微生物をモニタリングするために使用する方法。
- [7] 前記抗原又は抗体をエレクトロスプレイ・デポジション法でマイクロ流路チップに直接的に又は間接的に固定化することを特徴とする、請求項6記載の方法。
- [8] 前記実験動物がマウス又はラットである、請求項6記載の方法。
- [9] 前記実験動物がマウスであって、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、エレトメリアウイルス(Ectomelia virus)、マウスアデノウイルス、リンパ球性脈絡膜膜炎ウイルス(LCMV)、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、マウスロタウイルス(Mouse rotavirus、EDIMV)、マウスパ

ルボウイルス(Mouse parvovirus、MVM/MPV)、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus、TMEV)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice、PVM)、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス(Lactose dehydrogenase elevating virus)、クロストリジウム・ピリフィオルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、パステツレラ・ニューモトロビカ(Pasteurella pneumotropica)、シラーアソシエッティド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、エシェリキア・コリ O115 a,c;K(B)(Escherichia coli O115 a,c;K(B))、ヘリコバクター・ヘパティカス(Helicobactor hepaticus)、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spiroplasm muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である、請求項6記載の方法。

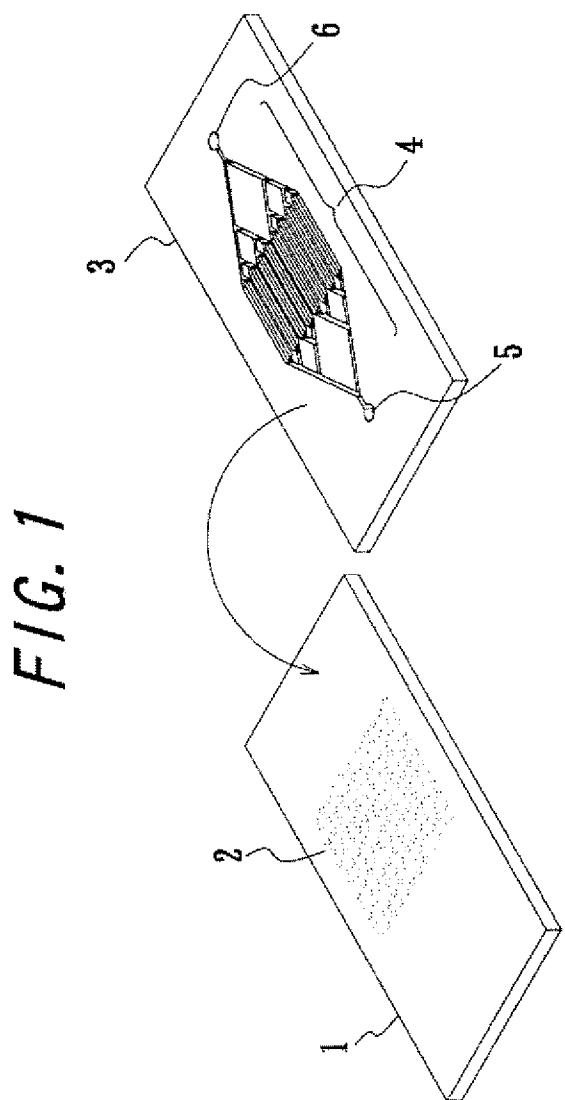
- [10] 前記実験動物がラットであって、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、マウスアデノウイルス、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、ラットパルボウイルス(Rat parvovirus(KRV/H-1/RPV))、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus(TMEV))、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice(PVM))、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、クロストリジウム・ピリフィオルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、ボーデテラ・ブロンチセプティア(Bordetella bronchiseptiae)、パステツレラ・ニューモトロビカ(Pasteurella pneumotropica)、 streptococcus pneumoniae)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ(Streptococcus pneumoniae)、シラーアソシエッティド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)

muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spironucleus muris)及びヘルミンス(蟻虫)(
Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である
、請求項6記載の方法。

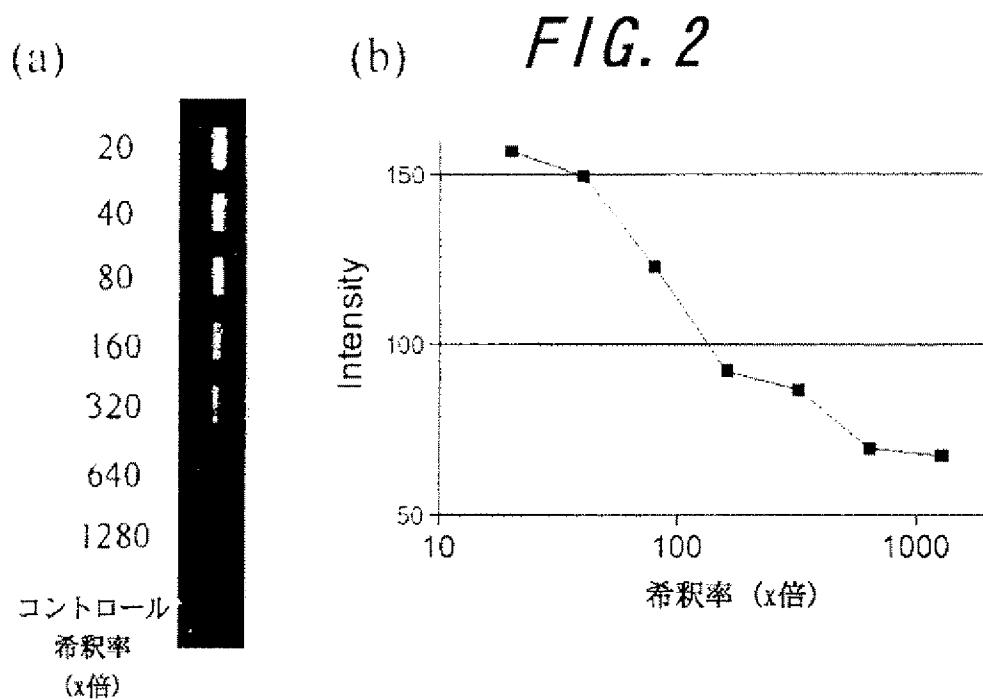
- [11] 実験動物の感染病の原因となる微生物の抗原又は抗体が直接的に又は間接的に固定化され、当該微生物をモニタリングするために使用されるマイクロ流路チップ。
- [12] 前記抗原又は抗体がエレクトロスプレイ・デポジション法で直接的に又は間接的に固定化されたことを特徴とする、請求項11記載のマイクロ流路チップ。
- [13] 前記実験動物がマウス又はラットである、請求項11記載のマイクロ流路チップ。
- [14] 前記実験動物がマウスであって、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウイルス(HVJ)、エレトメリアウイルス(Ectomrlia virus)、マウスアデノウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、マウスロタウイルス(Mouse rotavirus、EDIMV)、マウスパルボウイルス(Mouse parvovirus、MVM/MPV)、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus、TMEV)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice、PVM)、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス(Lactose dehydrogenase elevating virus)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、パステウレラ・ニューモトロピカ(Pasteurella pneumotropica)、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、エシェリキア・コリ O115 a,c;K(B)(Escherichia coli O115 a,c;K(B))、ヘリコバクター・ヘパティカス(Helicobactor hepaticus)、シュードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spirospira muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である、請求項11記載のマイクロ流路チップ。
- [15] 前記実験動物がラットであって、前記抗原がマウス肝炎ウイルス(MHV)、センダイウ

イルス(HVJ)、マウスアデノウイルス、ハンタウイルス(Hantaan virus)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis)、ティザー菌(Clostridium piliforme)、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of mice)、ラットパルボウイルス(Rat parvovirus(KRV/H-1/RPV))、マウス脳脊髄炎ウイルス(Mouse encephalomyelitis virus(TMEV))、マウス肺炎ウイルス(Pneumonia virus of Mice(PVM))、マウスアデノウイルス(Mouse Adenovirus)、レオウイルス3型(Reovirus type3)、クロストリジウム・ピリフォルメ(Clostridium piliforme)、コリネバクテリウム・クッチャリ(ネズミコリネ病菌,Corynebacterium kutscheri)、ボーデテラ・ブロンチセプティア(Bordetella bronchiseptia)、パステウレラ・ニューモトロピカ(Pasteurella pneumotropica)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ(Streptococcus pneumoniae)、シラーアソシエッテッド レスピレトリーバチルス(カーバチルス)(Cilia-associated respiratory(CAR) bacillus)、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、ギィアルディア・ムリス(Giardia muris)、スピロヌクレウス・ムリス(Spirotrichomonas muris)及びヘルミンス(蟻虫)(Helminths(pinworms))からなる群から選択された感染病の原因微生物の抗原である、請求項11記載のマイクロ流路チップ。

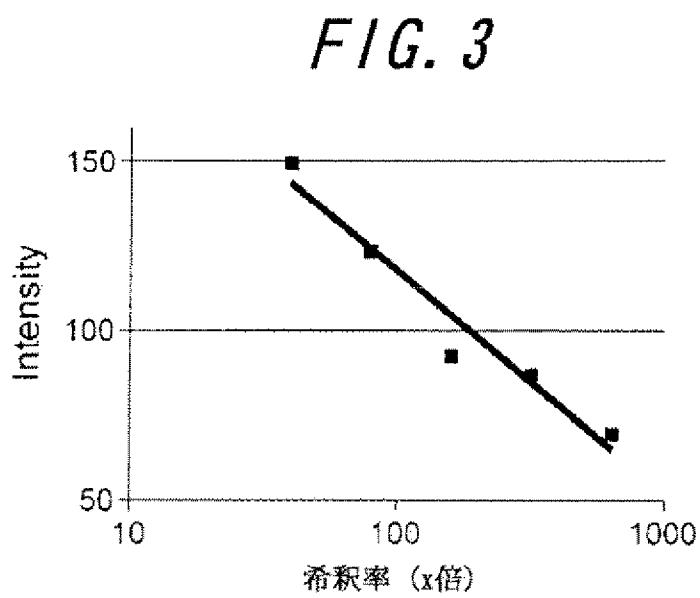
[図1]



[図2]



[図3]

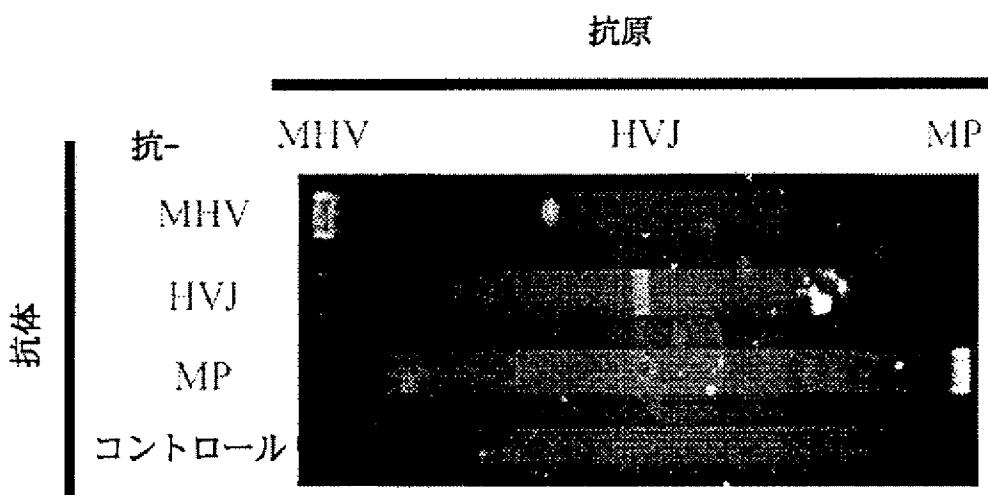


$$\text{強度} = -65.3 \times \log(\text{希釀率}) + 248$$

$$r^2 = 0.950$$

[図4]

FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/569, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/569, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-243734 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 28 August, 2002 (28.08.02), Claims; Par. Nos. [0024], [0026]; drawings & EP 1371990 A & US 2004-121356 A & WO 02/065138 A	1-15
Y	JP 2004-061229 A (Hitachi, Ltd.), 26 February, 2004 (26.02.04), Claims; Par. Nos. [0021] to [0023]; Fig. 5 (Family: none)	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"%" document member of the same patent family

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

Date of the actual completion of the international search
18 March, 2005 (18.03.05)Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C 17 G01N33/569, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C 17 G01N33/569, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-243734 A(理化学研究所) 2002.08.28 特許請求の範囲【0024】～【0026】図面 等参照 & EP 1371990 A & US 2004-121356 A & WO 02/065138 A	1-15
Y	JP 2004-061229 A(株式会社日立製作所) 2004.02.26 特許請求の範囲【0021】～【0023】図5等参照 (ファミリーなし)	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18.03.2005	国際調査報告の発送日 05.4.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 加々美一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3251 2 J 9408